

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2002-125689  
(P2002-125689A)

(43)公開日 平成14年5月8日(2002.5.8)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 0 7 K 14/195	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/195		14/36	4 B 0 5 0
14/36		19/00	4 B 0 6 3
19/00		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15		1/19	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 請求項の数11 書面 (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000-366248(P2000-366248)

(22)出願日 平成12年10月25日(2000.10.25)

(71)出願人 596153357  
早出 広司  
東京都目黒区南1-13-16  
(72)発明者 早出 広司  
東京都目黒区南1-13-16

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 融合蛋白質

(57)【要約】

【課題】ビオチン結合部位とグルコース脱水素酵素活性を有する融合蛋白質を提供する。

【解決手段】 P Q Q グルコース脱水素酵素とストレプトアビジンのビオチン結合部位とを融合した蛋白質の遺伝子を構築し、さらに該遺伝子を組み込んでなる組み換えベクターを微生物に形質転換することによって得られた形質転換体を培養し、該培養物から採取される融合蛋白質、その製造方法、およびこれを用いた分析方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ピロロキノリンキノングルコース脱水素酵素(PQQGDH)にストレプトアビジンのビオチン結合部位を含む蛋白質が連結された融合蛋白質。

【請求項2】 前記PQQGDHが*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHである、請求項1記載の融合蛋白質。

【請求項3】 前記ストレプトアビジンのビオチン結合部位を含む蛋白質が*Streptomyces*属由来のストレプトアビジン由来である請求項1または2に記載の融合蛋白質。

【請求項4】 前記ストレプトアビジンのビオチン結合部位を含む蛋白質が*Streptomyces avidinii*由来のストレプトアビジン由来である請求項1-3のいずれかに記載の融合蛋白質。

【請求項5】 以下の(a)または(b)の蛋白質である融合蛋白質

(a) 配列表・配列番号1記載に記載されるアミノ酸配列からなる蛋白質。

(b) アミノ酸配列(a)において1、もしくは数個のアミノ酸配列が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつグルコース脱水素酵素活性を有する蛋白質。

【請求項6】 以下の(c)または(d)の蛋白質をコードする遺伝子。

(c) 配列表・配列番号2に記載された塩基配列からなるDNA

(d) 上記(c)の配列において1、もしくは数個の塩基配列が欠失、置換もしくは付加されており、かつグルコース脱水素酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。

【請求項7】 請求項6に記載の遺伝子を含むベクター。

【請求項8】 請求項6に記載の遺伝子を含む形質転換体。

【請求項9】 請求項6に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれた生物。

【請求項10】 請求項1-6のいずれかに記載の融合蛋白質を含むグルコースアッセイキット。

【請求項11】 請求項1-6のいずれかに記載の融合蛋白質を含むグルコースセンサー。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はピロロキノリンキノン(PQQ)を補酵素とするグルコース脱水素酵素(GDH)にストレプトアビジンのビオチン結合部位を含む蛋白質が連結された融合蛋白質、ならびにその製造方法、およびそのグルコースの定量、免疫分析への応用に関する。

【0002】

【従来の技術】PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。一方、水溶性PQQGDHは*Acinetobacter calcoaceticus*のいくつかの株においてその存在が確認されており(Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59(8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている(Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436)。A. calcoaceticus由来水溶性PQQGDHは、ペリプラズムに局在する、分子量約50kDaの2つの同一のサブユニットからなるホモダイマーである。PQQGDH活性は、ホモダイマー酵素が形成される場合にのみ発現され、サブユニット単独ではPQQGDH活性を示さないことが報告されている。水溶性PQQGDHの生理学的役割はまだよく解明されていない。血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上極めて重要な指標である。また、微生物を用いる発酵生産におけるグルコース濃度の定量がプロセスモニタリングにおいて重要な項目となっている。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ(GOD)あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PDH)を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要があった。またGODを用いるバイオセンサーの開発も進められてきたが、反応が水溶液中の溶存酸素濃度に依存することから高濃度のグルコース試料には適さないこと、あるいは溶存酸素濃度によって測定値に誤差が生じる可能性があった。そこで、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてPQQGDHの応用が注目されている。PQQGDHはグルコースに対して高い酸化活性を有していること、およびPQQGDHは補酵素結合型の酵素であるため電子受容体として酸素を必要としないことから、グルコースセンサーの認識素子をはじめとして、アッセイ分野への応用が期待されている。また、その触媒能力が高いことから様々分野への応用が期待されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ストレプトアビジンのビオチン結合部位を含む蛋白質(以下ストレプトアビジン)と連結されたPQQGDHを構築し、繁殖性の高いPQQGDHを提供することを目的とする。

【0004】

3  
【課題を解決するための手段】本発明者は、PQQGDHにストレプトアビジンを連結した融合蛋白質を形成することにより、本発明を完成した。

【0005】すなわち、本発明は、リンカーペプチドを介して連結されたPQQGDHとストレプトアビジンとの融合蛋白質を提供する。好ましくは、PQQGDHとして *Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHである該融合蛋白質である。また、好ましくはストレプトアビジンとして *Streptomyces avidinii*、より好ましくは *Streptomyces avidinii* IF013429株由来のストレプトアビジンを含む該融合蛋白質である。

【0006】本発明はまた、本発明の融合蛋白質をコードする遺伝子、ならびに該遺伝子を含むベクターおよび形質転換体、および該遺伝子が主染色体に組み込まれた生物を提供する。本発明はまた、本発明の融合蛋白質を含むグルコースアッセイキット、ならびにグルコースセンサーまたは免疫分析キットを提供する。

【0007】

【発明の実施の形態】融合蛋白質の構造

本発明の融合蛋白質は、PQQGDHにストレプトアビジンが連結された構造を有する融合蛋白質である。

【0008】本発明の融合蛋白質はPQQGDHとストレプトアビジンとの間のリンカー領域のアミノ酸配列は蛋白質加水分解を受けやすいことが知られている部分配列を含まないように設計すべきである。PQQGDHにおいては、アミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。特定の領域のアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で置換することにより、酵素の熱安定性や基質に対する親和性を改良することができる（たとえば、特開平10-243786、特願平11-101143、特願平11-124285を参照）。これらの改変されたPQQGDHが連結された融合蛋白質も本発明の範囲内である。

【0009】好ましくは、PQQGDHは *Acinetobacter calcoaceticus* 由来の水溶性PQQGDHである。当業者は、他の細菌に由来する水溶性PQQGDHについても、本発明の教示にしたがってストレプトアビジンを連結して発現させることにより、本発明の融合蛋白質を得ることができる。これらの融合蛋白質も本発明の範囲内である。

【0010】またストレプトアビジンとしてはビオチンと結合能力を有するものであればよく、ストレプトアビジンのビオチン結合部位の蛋白質をPQQGDHに連結することによって本融合蛋白質を構築できる。

【0011】好ましくはストレプトアビジンは *Streptomyces avidinii* 由来、より好ましくは同IF013429株由来のストレプトアビジンあ

るいはストレプトアビジンのビオチン結合部位の蛋白質をPQQGDHに連結することにより本融合蛋白質を構築できる。

【0012】融合蛋白質の製造方法

図1は、本発明の融合蛋白質の概要およびこれをコードするベクターの構築方法を示す。本発明の融合蛋白質は、PQQGDHとストレプトアビジンとを連結させたインフレーション融合を行うことにより作成することができる。*Acinetobacter calcoaceticus* 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は、Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436に開示される。*Streptomyces avidinii* 由来ストレプトアビジンをコードする遺伝子の配列はNucleic Acids Research (1986), 14

(4):1871-1882に開示される。

【0013】本発明の融合蛋白質をコードする遺伝子を、PQQGDHをコードする遺伝子をストレプトアビジンとを連結することにより構築する。このとき、各蛋白質の遺伝子がインフレーションで融合蛋白質として発現されるように連結する。リンカーとしては、天然または合成の任意の配列を用いることができる。例えば、ベクター中の適当な配列を用いてもよく、合成遺伝子を調製してもよい。このような遺伝子操作のための種々の方法は、当該技術分野において知られている。このようにして得た融合蛋白質をコードする遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外來性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

【0014】上述のようにして得られた、融合蛋白質を発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎する。これを超遠心分離し、PQQGDH活性を含む水溶性画分を得ることができる。あるいは本融合蛋白質が不溶性の顆粒として産生されている場合には、細胞破碎液より遠心分離機によって沈澱として顆粒を回収し、これを尿素等の変性剤で可溶化したのち、透析により蛋白質立体構造を巻き戻し、活性のある融合蛋白質として水溶性画分として回収する。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の融合蛋白質を調製する。

【0015】酵素活性の測定方法

本発明の融合蛋白質は、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒

する作用を有する。酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。

#### 【0016】グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う融合蛋白質を含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う融合蛋白質を少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の融合蛋白質に加えて、アッセイに必要な緩衝液、電子受容体、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。電子受容体としてはPMS、DCIP、フェリシアン化カリウム、さらにシクロクロムなどを用いることができる。本発明に従う融合蛋白質は種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の融合蛋白質はホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

#### 【0017】グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う融合蛋白質を用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の融合蛋白質はホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別\*

＊の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の融合蛋白質をカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。

【0018】グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl<sub>2</sub>、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジメトサルフェートなどを用いることができる。またこれらのメディエーターに加えてシクロクロムを添加する場合もある。作用電極として本発明の融合蛋白質を固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

#### 【0019】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 実施例1

##### 融合蛋白質の構築

融合蛋白質の構築方法ならびに発現用のベクターを図1に示す。融合蛋白質を構築するためのそれぞれの遺伝子フラグメントは以下のようにして調製した。PQQGDHの構造遺伝子はA. calcoaceticus L MD79.41 (the Netherlands Culture Collection) 由来の天然のPQQGDH構造遺伝子をテンプレートとして、所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には、次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

フォワード 5'-GGCCATGGATAAACATTATTGGCTAAAAATTGCTTTAT-3'

リバース 5'-GGGAGCTCCTTAGCCTTATAGGTGAACCTTAATGAG-3'

このPCRプライマーにより増幅された遺伝子フラグメントをNcoIとSacIの2種類の制限酵素で消化した後、発現ベクターpTrc99A (Pharmacia社)のクローニング部位であるNcoI/SacI部位に挿入した。得られたプラスミドpGB16と命名した。一方、ストレプトアビジンのビオチン結合領域を含※

フォワード 5'-GGGAGCTCGAGGCCGGCATCACCGGCACCT-3'

リバース 5'-GGTCTAGACTACTGCTGAACGGCGTCGAGCGGGTT-3'

このPCRプライマーにより増幅されたストレプトアビジンのビオチン結合領域を含む蛋白質をコードする構造遺伝子約450bpの遺伝子断片を制限酵素SacIお

※む蛋白質をコードする構造遺伝子はStreptomyces avidinii IF013429から調製したゲノム遺伝子から、同領域をコードする遺伝子断片を所望の制限酵素部位を含むように、PCR反応により増幅した。PCR反応には、次の1組のオリゴヌクレオチドプライマーを用いた。

よびXbaIで消化した。さらに先に構築したプラスミドpGB16を制限酵素SacIおよびXbaIで消化し、そこにここで調製したストレプトアビジンのビオチ

(5)

7

ン結合領域を含む蛋白質をコードする構造遺伝子を挿入し、ライゲーションし、ベクター、pGBSAを構築した。

#### 【0020】実施例2

##### 融合蛋白質の製造および精製

- ・ 宿主細胞としては、挿入変異によりPQQGDH構造遺伝子が壊されているE. coli PP2418株 (Cleton-Jansen et al., 1990) を用いた。この株を実施例1で得られたプラスミドpGBSAでそれぞれトランスフォームし、各形質転換体をL-ブロス中で600nM PQQおよび5mM CaCl<sub>2</sub>の存在下で37℃で好氣的に培養した。中期対数増殖期で0.3mM IPTGを加え、さらに30℃で後期対数増殖期まで培養した。細胞を回収し、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中でフレンチプレスにより破壊し (110Mpas)、超遠心分離 (160, 500g, 1h, 4℃) を行った。酵素活性は水溶性画分中に認められた。この画分を回収し、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で透析した。

#### 【0021】実施例3

##### 融合蛋白質の分子量の測定

実施例2で得られた粗精製酵素を、10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したカチオン交換クロマトグラフィー (CM-Toyopearl 650M) に供し、0.8M NaCl/10mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出した。活性を示す画分を非変性条件下でゲル濾過クロマトグラフィー (G-3000、トソー社) に供したところ、活性画分は、融合蛋白質について予測されるとおり、約65kDaの分子量を有していた。このようにして得られた画分を融合蛋白質標品として以下の実験に用いた。

#### 【0022】実施例4

##### 酵素アッセイ

酵素活性は、酵素を10mM MOPS緩衝液 (pH 7.0) 中で、1mM CaCl<sub>2</sub> および1μM PQQの存在下で室温で10分間インキュベートした後、0.6mM フェナジンメトサルフェート、0.06mM 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) の存在下で、25℃で600nmの吸光度の減少速度を測定することにより測定した。

#### 10 【0023】実施例5

##### 酵素センサーの作製および評価

- 5 Uの融合蛋白質にカーボンペースト20mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、既にカーボンペーストが約40mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10mM MOPS緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で30分間処理した後、20mM リジンを含む10mM MOPS緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で20分間処理してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10mM MOPS緩衝液 (pH 7.0) 中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の融合蛋白質を固定化した酵素センサーを用いて、0.1mM-5mMの範囲でグルコースの定量を行うことができる。

#### 20 【0024】

【発明の効果】 上述のようにビオチン結合部位を有しグルコース脱水素酵素活性を有する融合蛋白質が構築できた。さらに本融合蛋白質を大腸菌で調製できるようになり、糖の分析が行えるようになった。

30

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Koji. Sode

&lt;120&gt; fusion protein

&lt;130&gt; TUAT0008

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 626

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Glucose  
dehydrogenase activity with biotin binding site

&lt;400&gt; 1

Met Asp Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Ala Leu Leu Ser Ala Val Gln  
1 5 10 15Leu Val Thr Leu Ser Ala Phe Ala Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln  
20 25 30Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn Dhe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser  
35 40 45Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile  
50 55 60Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu  
65 70 75 80Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp  
85 90 95Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe  
100 105 110Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys  
115 120 125

11  
 Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr  
 130 135 140

12  
 Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala  
 145 150 155 160

Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly  
 165 170 175

Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln  
 180 185 190

Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln  
 195 200 205

Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu  
 210 215 220

Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn  
 225 230 235 240

Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly  
 245 250 255

Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro  
 260 265 270

Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly  
 275 280 285

Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala  
 290 295 300

Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn  
 305 310 315 320

Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp  
 325 330 335

Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln  
 340 345 350

Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile  
 355 360 365

Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly  
 370 375 380

13  
 Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu  
 385 390 395 400

14  
 Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr  
 405 410 415

Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg  
 420 425 430

Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp  
 435 440 445

Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu  
 450 455 460

Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Lys Ala Lys Glu Leu  
 465 470 475 480

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe  
 485 490 495

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser  
 500 505 510

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp  
 515 520 525

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val  
 530 535 540

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser  
 545 550 555 560

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu  
 565 570 575

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val  
 580 585 590

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp  
 595 600 605

Ala Ala Lys Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val  
 610 615 620

Gln Gln  
 625



<210> 2  
 <211> 1881  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Glucose  
 dehydrogenase activity with biotin binding site

<400> 2

```

atggataaac atttattggc taaaattgct ttattaagcg ctgttcagct agttacactc 60
tcagcatttg ctgatgttcc tctaactcca tctcaatttg cttaaagcgaa atcagagAAC 120
tttgacaaga aagttattct atctaactta aataagccgc atgctttgtt atggggacca 180
gataatcaaa tttggttaac tgagcgagca acaggtaaga ttctaagagt taatccagag 240
tcgggttagtg taaaaacagt ttttcaggta ccagagattg tcaatgatgc tgatgggcag 300
aatggtttat taggttttgc cttccatcct gattttaaaa ataatcctta tatctatatt 360
tcaggtacat ttaaaaatcc gaaatctaca gataaagaat taccgaacca aacgattatt 420
cgtcgttata cctataataa atcaacagat acgctcgaga agccagtcga tttattagca 480
ggattacctt catcaaaaga ccatcagtcg ggtcgtcttg tcattggggc agatcaaaag 540
atattattata cgatttgtga ccaagggcgt aaccagcttg cttatttgtt cttgccaaat 600
caagcacaac atacgccaac tcaacaagaa ctgaatggta aagactatca cacctatatg 660
ggtaaaagtac tacgcttaaa tcttgatgga agtattccaa aggataatcc aagttttaac 720
ggggtggtta gccatattta tacacttga catcgtaatc cgcagggtt agcattcact 780
ccaaatggta aattattgca gtctgaacaa ggcccaaact ctgacgatga aattaacctc 840
attgtcaaag gtggcaatta tggttggccg aatgtagcag gttataaaga tgatagtggc 900
tatgcttatg caaattatc agcagcagcc aataagtcaa ttaaggattt agctcaaaat 960
ggagtaaaag tagccgcagg ggtccctgtg acgaaagaat ctgaatggac tggtaaaaaa 1020
tttgtccac catraaaaac tttatatacc gttcaagata cctacaacta taacgatcca 1080
acttggtgag agatgaccta catttgctgg ccaacagttg caccgtcatc tgcctatgtc 1140
tataagggcg gtaaaaaagc aattactggt tgggaaaata cattattggt tccatcttta 1200
aaacgtggtg tcattttccg tattaagtta gatccaactt atagcactac ttatgatgac 1260
gctgtaccga tgtttaagag caacaaccgt tatcgtgatg tgattgcaag tccagatggg 1320
aatgtcttat atgtattaac tgatactgcc ggaaatgtcc aaaaagatga tggctcagta 1380
acaaatacat tagaaaacc aggatctctc attaagttca cctataaggc taaggagctc 1440
gaggccggca tcaccggcac ctggtacaac cagctcggct cgacctcat cgtgaccgcy 1500
ggcgccgacg gcgccctgac cggaacctac gagtcggccg tcggcaacgc cgagagccgc 1560
tacgtcctga ccggtcgtta cgacagcgcc ccggccaccg acggcagcgg caccgccctc 1620
ggttggaagg tggcctggaa gaataactac cgcaacgcc actccgcgac cagctggagc 1680
ggccagtacg tcggcgccgc cgaggcgagg atcaacaccc agtggctgct gacctccggc 1740
accaccgagg ccaacgcctg gaagtccacg ctggtcggcc acgacacctt caccaaggtg 1800
aagccgtccg ccgcctccat cgacgcggcg aagaaggccg gcgtcaacaa cggcaacccg 1860
ctcgacgcg ttcagcagta g 1881

```

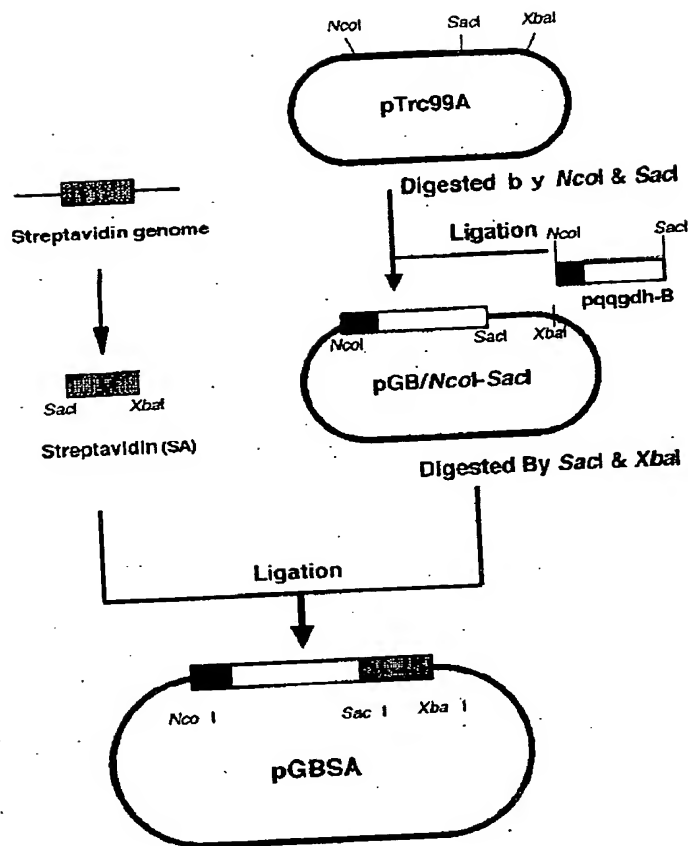
【図面の簡単な説明】

クターの構築方法を示す。

【図1】 図1は、本発明の融合蛋白質をコードするベ

(10)

【図 1】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 N 1/19  
1/21  
5/10  
9/04  
C 1 2 Q 1/00  
1/32  
G 0 1 N 27/30  
27/327  
27/416

識別記号

F I

C 1 2 N 1/21  
9/04  
C 1 2 Q 1/00  
1/32  
G 0 1 N 27/30  
C 1 2 N 15/00  
5/00  
G 0 1 N 27/30

テーマコード (参考)

D  
B  
B  
Z N A A  
A  
3 5 3 S  
3 5 3 J  
3 5 3 R  
3 5 3 T  
3 5 3 F  
3 3 8

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA11 BA08 BA80 CA02  
CA06 CA07 DA06 EA04 GA11  
HA01  
4B050 CC04 CC05 DD02 FF05E  
LL03  
4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ68 QR04  
QR22 QS39  
4B065 AA04Y AA26X AA50Y AB01  
AC14 AC16 BA02 CA28 CA46  
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA11  
DA89 EA50 FA73 FA74 GA10  
HA06